



TITLE:

# タンパク質の人工機能化の基礎と センサーへの応用

AUTHOR(S):

内之宮, 祥平; 浜地, 格

---

CITATION:

内之宮, 祥平 ...[et al]. タンパク質の人工機能化の基礎とセンサーへの応用. ぶんせき 2010, 432: 653-660

ISSUE DATE:

2010-12-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/194027>

RIGHT:

© 日本分析化学会

## 講義

# タンパク質の人工機能化の基礎と センサーへの応用

タンパク質は、多彩な機能を持つ生体分子である。このタンパク質本来の機能を活かしつつ人工的に機能を付与することで、様々な生体分子や生命現象を検出可能なバイオセンサーを開発することができる。本稿では、タンパク質の人工機能化とバイオセンサーの開発に関する最近の研究例を解説する。また、近年我々が開発した、細胞内でタンパク質を機能化可能なリガンド指向型トシル化学も合わせて紹介する。

内之宮 祥平，浜 地 格

## 1 タンパク質の人工機能化の意義とその方法

タンパク質は生体内において、物質変換・認識・運搬・情報伝達などを行う多機能な生体分子である。古くから科学者は、タンパク質の多機能性を利用し、また人工的に機能改変することで生命現象の解明を試みてきた。タンパク質の人工機能化の最たる例は、その工学的応用やバイオセンサー化であろう。タンパク質には、特定の生体分子と特異的に相互作用するものが知られている。そこでタンパク質に、生体分子との相互作用を光・電子・誘電率その他の物理信号に変換する分子を修飾することができれば、生体分子を特異的に検出可能なバイオセンサーを構築することができる。

タンパク質を人工的に機能化する手法としては、大きく分けて二通りある。一つは、分子生物学的手法の活用であり、緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein, GFP）に代表される蛍光タンパク質（fluorescent protein, FP）を対象タンパク質に融合した蛍光バイオセンサーは、その代表例である。もう一つは、化学的方法論をも活用して、合成小分子プローブをタンパク質に修飾する手法である。

蛍光タンパク質を用いる手法では、対象タンパク質と蛍光タンパク質を遺伝子レベルで融合し、発現させる。この手法には、遺伝子導入さえ可能であれば、非侵襲的という利点がある。そのため、細胞や生体試料を損傷することなくタンパク質を機能化することが可能であり、生細胞実験に適している。

一方、合成小分子プローブを用いる手法では、様々なプローブを目的のタンパク質のアミノ酸と反応させることで、タンパク質を機能化する。この手法の大きな利点は、プローブを自由に選択できるため蛍光のみならず、電気化学法や MRI, PET など、検出モードの幅が広がるという点である。

これらの機能化法により様々なバイオセンサーが開発され、多くの基礎・応用研究に使われてきた。本稿では、これらタンパク質の人工機能化とセンサーへの応用に関して概説する。

## 2 蛍光タンパク質による機能化と蛍光センサーの構築

### 2.1 蛍光タンパク質による機能化

蛍光タンパク質融合法は、生体機能の解明に最も貢献したタンパク質機能化法の一つである。GFP は 27 kDa のタンパク質であり、1962 年に Shimomura らによってオワンクラゲから単離された<sup>1)</sup>。また、1992 年に Prasher らによって GFP 遺伝子が同定され、GFP を目的タンパク質に遺伝子レベルで融合させることが可能となった<sup>2)</sup>。さらに、Tsien らによって、光安定性や蛍光強度が改善され、より長波長光による励起が可能となった enhanced GFP (EGFP) が開発された<sup>3)</sup>。これら一連の研究により、タンパク質の細胞内での挙動を解析するツールとしての GFP が確立された。現在では 440 nm から 648 nm の範囲における様々な波長の蛍光タンパク質が開発されており<sup>4)</sup>、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) による解析やマルチカラーイメージングなども可能となっている。

蛍光タンパク質による機能化では、まず対象タンパク質遺伝子がコードされたプラスミドに、蛍光タンパク質遺伝子を挿入する。その後、プラスミドを細胞にトランスフェクションすることで、蛍光タンパク質を融合した状態で対象タンパク質を細胞内に発現させることができる {図 1(a)}。このようにして、興味の対象であるタンパク質の細胞内での局在・挙動を蛍光で直接観測することができるようになった。また、単に局を観測だけではなく、バイオセンサー構築ツールとしても蛍光タンパク質は広く用いられている。

Strategies of Protein Functionalization for Protein-Based Biosensors.

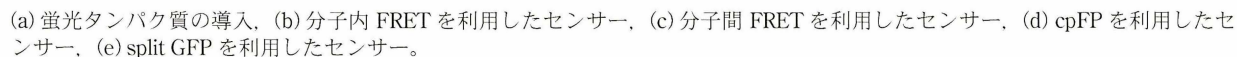


図1 蛍光タンパク質による機能化とセンサー開発

## 2.2 FRET を利用したバイオセンサー

FRET とは、ドナーとなる蛍光分子の励起エネルギーが、アクセプターとなる蛍光分子に移動する現象のことである。FRET 効率はドナー・アクセプター間の距離に依存する。そのため、タンパク質とリガンドの結合に伴うタンパク質のコンフォメーション変化を、FRET 効率の変化として読み出すことができる。また、FRET ではドナーとアクセプターの蛍光強度のレシオ値を算出するため、定量性に優れているという特徴を持つ。FRET ペアとしては、シアン蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein, CFP) と黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein, YFP) が最も広く用いられており、これらをリガンド結合能のあるタンパク質の末端に融合させる。FRET を利用したバイオセンサーは分子内 FRET と分子間 FRET を利用したものが開発されている。

分子内 FRET を利用したバイオセンサーでは、検出したい分子と特異的に結合するタンパク質に、FRET ペアとなり得る 2 種類の蛍光タンパク質を融合する {図 1(b)}。先駆的な研究として、Tsien らが開発したカルシウムバイオセンサーであるカメレオンがある<sup>5)</sup>。カルモジュリン (CaM) はカルシウム結合タンパク質の一つで、カルシウム存在下で M13 ペプチドと相互作用することが知られている。そこで彼らは、カルモジュリンと M13 ペプチドを直列につないだ複合体 (CaM-

M13) の両末端に CFP と YFP を融合した。すなわち、カルシウム存在下、CaM-M13 のコンフォメーション変化が誘起され、それが CFP-YFP 間の相対距離の変化、すなわち FRET 効率の変化へとつながり、カルシウムの濃度変化を蛍光レシオ値の変化として読み出すという戦略である。実際、彼らは、カメレオンを HeLa 細胞内に発現させ、様々な刺激によるカルシウム濃度変化をリアルタイムにイメージングし解析することに成功した。

リガンド結合に伴うタンパク質のコンフォメーション変化を分子内 FRET として読み出す戦略は非常に有効であり、同様の戦略で多くのバイオセンサーが開発されている。最近では Noji らはアデノシン三リン酸 (ATP) 検出用センサーを開発し、ATP が合成されているミトコンドリア内の ATP 濃度は、細胞質における ATP 濃度より低いことを見いだした<sup>6)</sup>。

一方、分子内 FRET だけでなく、分子間 FRET を利用したバイオセンサーも開発されている。このタイプのバイオセンサーは、異なる 2 種類のタンパク質にそれぞれ FRET ドナー、FRET アクセプターとなり得る蛍光タンパク質を導入する {図 1(c)}。例えば、Pozzanらはタンパク質キナーゼ A (PKA) を用いて cAMP センサーを開発した<sup>7)</sup>。PKA は触媒部位と調整部位からなり、cAMP が結合すると触媒部位が解離する。そこで彼らは、触媒部位と調整部位にそれぞれ YFP と CFP



を導入した。そして、触媒部位の解離に伴う YFP と CFP 間の FRET 効率の変化を利用して、細胞内の cAMP 濃度の変化を観測することに成功した。

また、分子間 FRET は、タンパク質間相互作用の解析にも活用されている。例えば、Wasylewska らはドーパミン D<sub>1</sub> 受容体と D<sub>2</sub> 受容体に、それぞれ CFP と YFP を導入した。そして、両者が相互作用し CFP と YFP 間の FRET 効率が増加することを利用して、D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub> 受容体のヘテロダイマー化を解析することに成功した<sup>8)</sup>。

### 2・3 FRET 以外のバイオセンサー

二つの蛍光タンパク質を用いずに、一つの蛍光タンパク質だけでバイオセンサーを構築することも可能である。代表的なものとして、circularly permuted Fluorescent Protein (cpFP) や split GFP を用いたセンサーが挙げられる。

cpFP とは、本来の N 末端と C 末端とをペプチドリンカーで結合し、蛍光団付近に新たに N 末端と C 末端をシフトした蛍光タンパク質である。cpFP をもとにしたバイオセンサーは、cpFP の N 末端と C 末端に別のタンパク質ドメインを挿入することで作成される。リガンドとの相互作用に伴う挿入タンパク質ドメインのコンフォメーション変化によって、cpFP の蛍光変化が誘起されるという戦略である {図 1 (d)}。例えば、Lukyanov らは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を選択的に検出可能なセンサーを開発した<sup>9)</sup>。大腸菌の OxyR の調整ドメイン (OxyR-RD) は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に酸化されることで、コンフォメーションが大きく変化する。そこで、彼らは OxyR-RD を cpYFP に挿入することで、細胞内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を検出することに成功した。また、同様の戦略で Yellen らは細胞内の ATP と ADP のレシオ値を測定可能なセンサーを開発した<sup>10)</sup>。

次に、split GFP を用いたセンサーを紹介する。GFP は 157 残基目と 158 残基目で N 末端断片と C 末端断片に二つに分割すると、蛍光を発しなくなる (split GFP)。しかし、両断片が近接すると GFP が再構成され、再び蛍光を発する<sup>11)</sup>。そこで、N 末端断片をタンパク質 A に、C 末端断片をタンパク質 B にそれぞれ連結し、A と B の相互作用に伴い両断片が近接することで、GFP を再構成させる。これによって A と B との相互作用や、相互作用を誘起する生体物質を蛍光ターンオンとして検出できるセンサーが開発できる {図 1 (e)}。例えば、Ghosh らは split GFP を DNA 結合タンパク質と連結させることで、特定の DNA 配列の検出に成功した<sup>12)</sup>。また、Ozawa らは split GFP とインテインとを組み合わせたセンサーを開発した。これは、二つに断片化したインテインと GFP を、対象のタンパク質 A、B にそれぞれ連結する。そして、A と B が相互作用する

とスプライシングが起こり、完全な GFP が再生する。彼らはこのセンサーを用いて、カルモジュリンと M13 ペプチドとの相互作用を検出することに成功した<sup>13)</sup>。また、彼らはこのシステムを用いて、ミトコンドリア局在タンパク質の解析<sup>14)</sup>や、ミトコンドリア mRNA の検出<sup>15)</sup>にも成功した。

蛍光タンパク質を利用したバイオセンサーは、設計原理と構築手法がかなり確立してきており、今後も更なる発展が期待される。

## 3 合成小分子プローブによるタンパク質の機能化

### 3・1 タンパク質表面アミノ酸への合成小分子プローブのラベル化

蛍光タンパク質によるタンパク質の人工機能化とセンサーの構築は、生体機能の解明に大きく貢献してきた。しかし、同時にその限界も指摘されている。まず、蛍光タンパク質自身が 27 kDa と大きいと、対象タンパク質の機能を阻害する可能性がある。また、検出モードが蛍光法に限られる。そのため、これらの問題点を克服するために、合成小分子プローブによるタンパク質機能化の研究が盛んに行われている。

この手法では、プローブを対象タンパク質表面のアミノ酸へ化学あるいは分子生物学的手法で修飾(ラベル化)する。この場合、ラベル化するプローブを変更することで検出モードを選択できるという利点がある。そのため、蛍光のみならず電気化学法や MRI, PET などによる検出も可能となる。また、サイズが小さいため対象タンパク質への機能阻害が軽減できる。しかし、タンパク質が変性しない水中・穏和な条件下でのラベル化が必須であり、利用可能なラベル化手法が限られている。

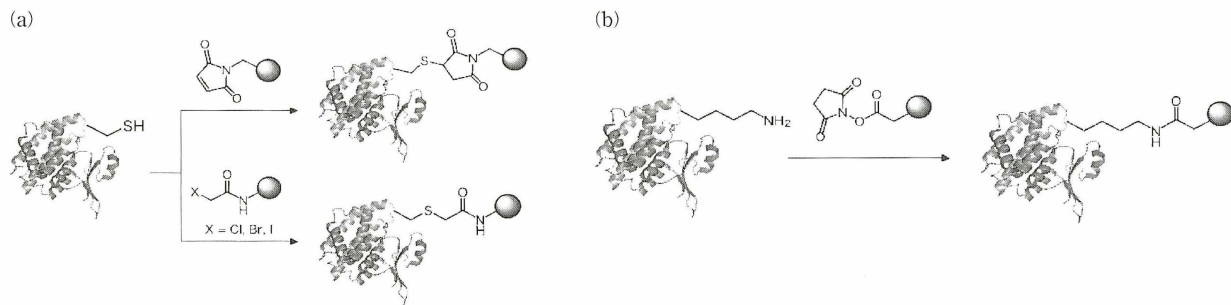
一般に、タンパク質表面の求核性アミノ酸を利用したラベル化が古くから汎用されてきた。代表例として、反応性の高いチオール基を側鎖に有するシステインと、マレイミドやハロゲン化アルキルなどとの反応が知られている {チオールケミストリー, 図 2(a)}。また、1 級アミンを側鎖に持つリジンと NHS 活性エステルとの反応も広く用いられてきた {図 2(b)}。

しかし、これらの反応では、タンパク質表面に部位特異的にプローブをラベル化することは難しい。なぜなら、一般のタンパク質表面には反応可能な求核性アミノ酸が複数存在し、それら全てと反応する可能性があるからである。バイオセンサーを構築するためには、修飾部位と修飾個数を厳密にコントロールした部位特異的な修飾法の開発が望まれる。

### 3・2 部位特異的変異法を利用した修飾とセンサーへの応用

タンパク質の部位特異的ラベル化法の一つに、部位特





(a) システインへのラベル化 (チオールケミストリー), (b) リジンのラベル化

図2 タンパク質表面の求核性アミノ酸を利用したラベル化

異の変異法に基づいた手法がある。部位特異的変異法とは、タンパク質の特定のアミノ酸を、遺伝子工学的に他のアミノ酸に置換する手法である。この手法の利点は、変異部位を自由に選択できることである。そのため、タンパク質の立体構造やリガンド結合部位の情報をもとに、合理的なバイオセンサーの設計が可能となる。この手法は、システインとの反応であるチオールケミストリーを利用する手法と、非天然アミノ酸導入に基づく手法に大別される。

### 3・2・1 チオールケミストリーを利用したセンサー開発

システインは、他のアミノ酸側鎖より反応性の高いチオール基を有するため、反応条件を選択することでシステインのみをラベル化することが可能となる。そのため、タンパク質が本来有しているシステインをあらかじめ別のアミノ酸に置換すれば、部位特異的変異によって新たに導入したシステインのみをラベル化可能となる {図3(a)}。

例えば、Morii らはイノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) と選択的に結合する PH ドメインを基体とした、IP<sub>3</sub> センサーの構築に成功した<sup>16)</sup>。彼らは PH ドメインと IP<sub>3</sub> 複合体の結晶構造をもとに、PH ドメインの IP<sub>3</sub> 結合部位近傍にシステインを導入した。そして、このシステインに環境応答性色素をラベル化することで、バイオセンサーを作製した。このセンサーに IP<sub>3</sub> を加えると、IP<sub>3</sub> 結合部位近傍のマイクロ環境の変化により蛍光色素の蛍光が変化し、IP<sub>3</sub> 感受性の蛍光センサーが得られたことになる。さらに Morii らは同様の手法を用いて、イノシトール四リン酸 (IP<sub>4</sub>) 選択的なバイオセンサーを開発した。そして、このバイオセンサーは細胞内の IP<sub>4</sub> 濃度変化をイメージング・測定することが可能であった<sup>17)</sup>。

Ghadiri らは、相補鎖 DNA 検出用の半合成アロステリック酵素を開発した {図3(b)}<sup>18)</sup>。彼らは、プロテアーゼに部位特異的変異を利用して、システインを導入した。次に、このシステインに、プロテアーゼ阻害剤を結合させた一本鎖 DNA をラベル化し、阻害剤-DNA-

プロテアーゼ連結体 (inhibitor-DNA-enzyme : IDE) を開発した。この IDE は、相補鎖 DNA が存在しない場合は、分子内に存在する阻害剤によりプロテアーゼ活性が抑制される。しかし、相補鎖 DNA が存在すると、IDE 中の DNA と二本鎖 DNA 形成することで阻害剤が活性ポケットから解離し、プロテアーゼ活性が回復する。この IDE と、切断によって蛍光を発するペプチド基質を利用して、相補鎖 DNA を蛍光によって検出する、という戦略である。この戦略では、酵素のターンオーバーによりシグナルが増幅されるという利点があり、10 pM という低濃度の DNA の検出に成功した。

さらに、1 分子測定可能なバイオセンサーの開発も報告されている。1 分子測定では、寿命の短い中間体も測定できるなどの利点がある。Bayley らは 1 分子測定可能なバイオセンサーを開発するために、膜タンパク質と、タンパク質 1 分子レベルの電気伝導度の変化を測定することができるパッチクランプ法に着目した。すなわち、膜タンパク質をバイオセンサー化しパッチクランプ法で測定することで、1 分子測定が可能になるという戦略である {図3(c)}。彼らは膜タンパク質の一種である  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ HL) を利用した。 $\alpha$ HL は  $\alpha$ HL モノマーの 7 量体であり、その中心にポア (穴) を持つ。彼らは 7 量体の一つに部位特異的変異によりシステインを導入し、これにプローブをラベル化した。そして、プローブと標的化合物の相互作用に伴う  $\alpha$ HL の電気伝導度の変化を、パッチクランプ法を用いて観測した。例えば、プローブとして一本鎖 DNA を導入し、標的となる相補鎖 DNA との二本鎖 DNA 形成の速度定数を算出することに成功した<sup>19)</sup>。また、ビオチンプローブを導入することで、ビオチンとアビジンとの相互作用の結合・解離速度を算出した<sup>20)</sup>。分子間の相互作用のみならず、システインとチオール種とのジスルフィド形成反応を、1 分子レベルで解析することも可能であった<sup>21)</sup>。

このように、部位特異的変異により、結晶構造をもとにして合理的なセンサーを開発することができる。チオールケミストリー以外にも、非天然アミノ酸をタンパク質に導入する方法も開発されている。

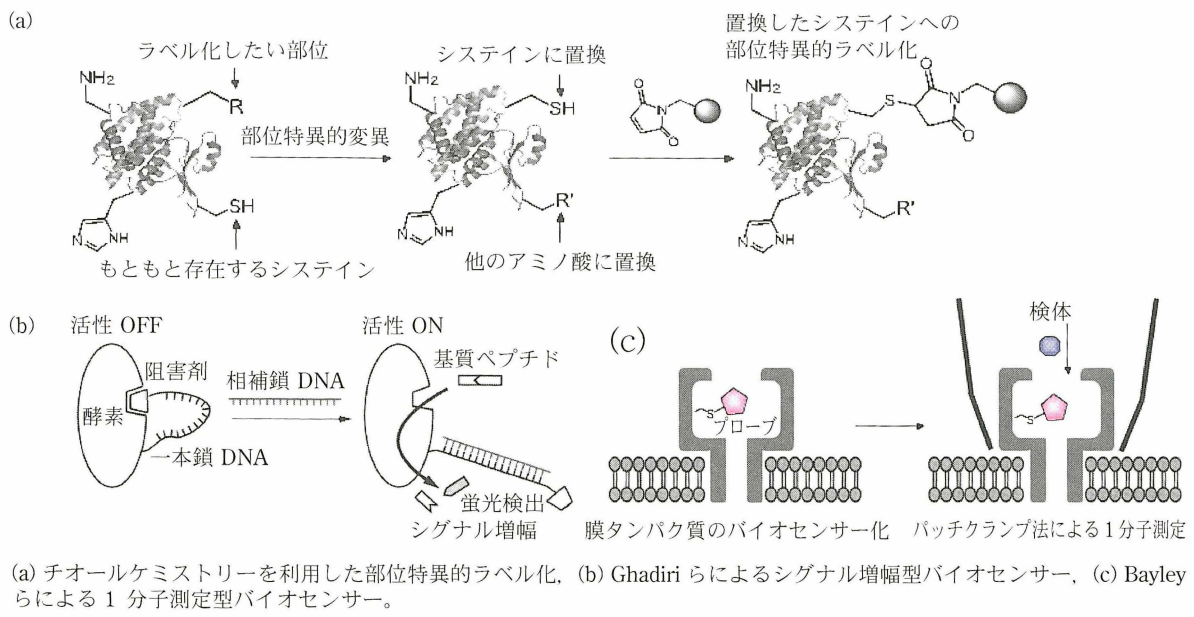


図 3 部位特異的変異法によるラベル化とセンサー開発

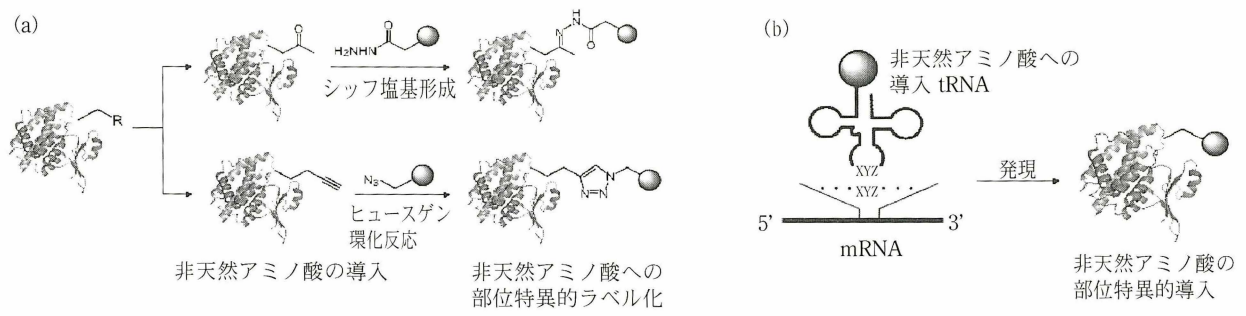


図 4 非天然アミノ酸による部位特異的ラベル化

### 3・2・2 非天然アミノ酸によるタンパク質の機能化とセンサー開発

非天然アミノ酸とは遺伝子にコードされていないアミノ酸のことであり、ケトン基やアルキンなどの官能基を有するものも合成されている。これらは、シッフ塩基形成やヒュースゲン環化反応などの生体直交性（bioorthogonality）を有する反応によってタンパク質をラベル化可能であり、他のアミノ酸との副反応を抑えることができる {図 4(a)}。また、蛍光色素自体を有する非天然アミノ酸も開発されており、一段階でタンパク質の部位特異的に蛍光色素を導入することもできる。

非天然アミノ酸をタンパク質へ導入する手法として、拡張コドン法が広く用いられている {図 4(c)}。拡張コドン法とは、mRNA 上で通常の tRNA が読み取らないコドン（非天然アミノ酸を導入した tRNA で読み取らせるという手法である。これによって、リボソームでタンパク質が合成される際に、非天然アミノ酸を部位特異的にタンパク質骨格に導入可能となる。

Schultz らは、終止コドンの一つであるアンバーコード

ン（UAG）を、非天然アミノ酸を有する tRNA に読み取らせ、大腸菌内で発現させる手法を開発した<sup>22)</sup>。この手法により、彼らはケトン基<sup>23)</sup>やアルキン<sup>24)</sup>を有する非天然アミノ酸をタンパク質に導入し、それぞれヒドラジドやアジド基との特異的な反応を利用して蛍光色素を部位特異的に導入することに成功した。最近彼らは、環境応答性蛍光色素である Prodan を持つ非天然アミノ酸（Anap）を部位特異的に導入したバイオセンサーの開発を行った<sup>25)</sup>。すなわち、グルタミン酸結合タンパク質（QBP）とグルタミン酸複合体の結晶構造をもとに、QBP のグルタミン酸結合部位近傍に Anap が導入された。このバイオセンサーは QBP とグルタミン酸の結合を、Anap 周辺のマクロ環境変化に伴う Prodan の蛍光変化として検出可能であった。

別の非天然アミノ酸導入法として、Sisido らは 4 塩基コドン法を開発した<sup>26)</sup>。これは、天然に存在しない 4 塩基コドン（非天然アミノ酸を導入した tRNA を用いて、非天然アミノ酸を部位特異的にタンパク質に導入する手法である。彼らは 4 塩基コドン法により、ナフタレンやフェロセン



を有する非天然アミノ酸の導入に成功した。また、Hohsakaらは、4塩基コドン法を用いて蛍光色素BODIPYを有する非天然アミノ酸をタンパク質に複数個導入し、リガンド結合に伴うタンパク質のコンフォメーション変化をFRETにより読み出すことに成功した<sup>27)</sup>。

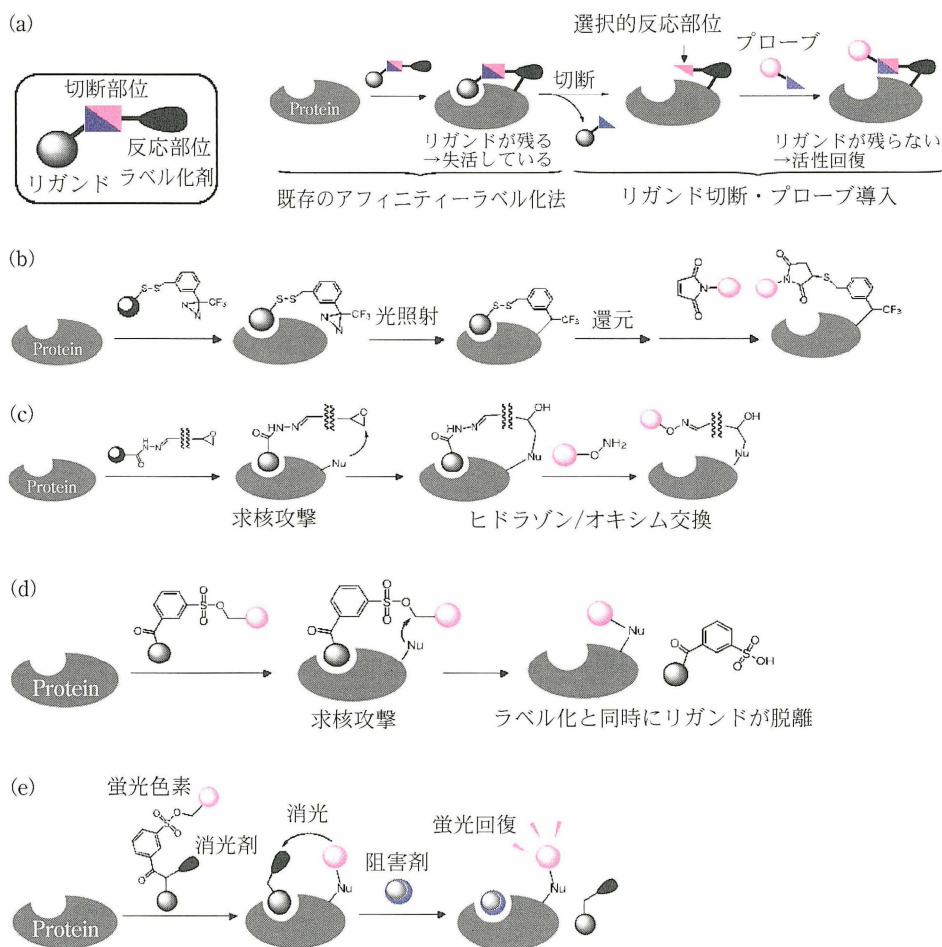
部位特異的変異法は、部位特異的なタンパク質修飾と合理的なバイオセンサーの設計を可能とした優れた手法である。しかし、この手法では遺伝子操作を必要とするため、生体に元々存在する内在性タンパク質をラベル化することは困難である。最近この問題を解決すべく、内在性タンパク質を標的としたラベル化法の開発も進められている。

### 3・3 リガンド指向型ラベル化法によるタンパク質の機能化

内在性のタンパク質をラベル化する手法として、古くからアフィニティーラベル化法が知られている〔図5(a)〕。これはラベル化したいプローブに、標的タンパク

質と親和性のあるリガンドと、タンパク質と反応し得る反応基を連結する(ラベル化剤)。そして、リガンドとタンパク質との相互作用によって、反応基がタンパク質と近接し反応を誘起することで、タンパク質のリガンド結合部位近傍にプローブがラベル化される。しかし、この手法ではタンパク質の基質結合部位がリガンドによって共有結合を介してマスクされたままであるため、タンパク質は活性を失ってしまう。そこで筆者らは、プローブがタンパク質にラベル化された後、リガンドが切り離される新しいラベル化法を模索した。

その第1弾として筆者らは、光アフィニティーラベル化後修飾(post-photoaffinity labeling modification, P-PALM)を考案した〔図5(b)〕<sup>28)29)</sup>。P-PALMでは、ラベル化剤のリガンドと反応基をジスルフィド結合で連結させている。そのため、ラベル化後に還元処理することで、リガンドを切断できる。同時にラベル化部位にはチオール基が生じるため、チオールケミストリーを利用して蛍光色素などのプローブをラベル化することができる。ラベル化剤の反応部位としては、光アフィニティー



(a) 既存のアフィニティーラベル化法とリガンド指向型ラベル化法, (b) 光アフィニティー後修飾法 (P-PALM), (c) アフィニティー後修飾法 (P-ALM), (d) リガンド指向型チル化学 (LDT化学), (e) 消光型 LDT 化学 (Q-LDT 化学)。

図5 リガンド指向型ラベル化法



ラベルが可能なジアジリン基が良い結果を与えた。例えば、P-PALM を利用して、糖結合タンパク質の一種であるコンカナバリン A (ConA) の糖結合部位近傍に環境応答性蛍光色素をラベル化すると、糖と ConA との結合を蛍光変化として読み出すことが可能となった。さらに、このバイオセンサーを用いて、細胞表面における糖鎖修飾されたタンパク質の蛍光イメージングや、細胞内のグルコース濃度変化を観察することに成功した。

しかし、P-PALM は多段階反応であり、ラベル化に光照射が必要であるため生細胞への適用は困難が予想される。そこで第 2 弾として、P-PALM を改良したアフィニティーラベル化後修飾 (post-affinity labeling modification, P-ALM) を開発した (図 5(c))<sup>30)</sup>。ここでは、ラベル化剤のリガンド部位と反応部位をシッフ塩基で連結した。このシッフ塩基結合はヒドラゾン/オキシム交換を利用することで、リガンドを切断すると同時に一段階でプローブを導入することができる。また、反応部位にはエポキシドを選択し、タンパク質表面の求核性アミノ酸からエポキシドへの求核、開環反応が起こり、プローブをリガンド結合部位近傍にラベル化することを期待した。実際に P-ALM に基づき、ヒト炭酸脱水酵素 (hCA) のバイオセンサー化に成功し、hCA の阻害剤蛍光アッセイに成功した。

P-PALM や P-ALM といったラベル化法では、チオールケミストリーやシッフ塩基交換反応といった反応を利用するため、チオール基やアルデヒド基が存在する生細胞内で用いることは難しい。そこで筆者らは第 3 弾として、ラベル化とリガンド切断が同時に起こる、リガンド指向型トシル化学 (ligand-directed tosyl (LDT) 化学) を開発した (図 5(d))<sup>31)</sup>。

LDT 化学では、タンパク質からの求核置換反応 ( $S_N2$  反応) を利用する。そのために、リガンドとプローブとをフェニルスルホン酸エステル基 (トシル基) で連結したラベル化剤を開発した。トシル基は有機化学反応において良好な脱離基として知られている。すなわち、ラベル化の際に対象タンパク質から求核攻撃を受けると同時にリガンド部位が脱離し、プローブのみがリガンド認識部位近傍にラベル化されるという戦略である。この戦略の有用性を実証するために、筆者らはまず精製した hCA のリガンド結合部位近傍に、部位特異的なラベル化を達成した。このラベル化は、hCA を発現している赤血球中でも hCA 選択的に進行した。さらに、驚いたことにマウス個体においても、その赤血球内の hCA を選択的にラベル化することが可能であった。この LDT 化学は、リガンドを変更すれば他のタンパク質にも適応可能であり、また蛍光色素や、MRI プローブである  $^{19}\text{F}$ MRI プローブ、アフィニティープローブであるビオチンなど、様々なプローブもラベル化可能である。実際、LDT 化学を用いて  $^{19}\text{F}$ MRI プローブを hCA にラベル化

し、赤血球中での阻害剤アッセイを  $^{19}\text{F}$ NMR で行う  $^{19}\text{F}$  型バイオセンサーの構築を生細胞中で実現した。

この LDT 化学は、消光型 LDT 化学 {quenched ligand-directed tosyl (Q-LDT) 化学} へと発展し、ラベル化後に蛍光が回復する Turn-On 型のバイオセンサーの合理的設計が可能となりつつある (図 5(e))<sup>32)</sup>。この手法では、蛍光色素の他に消光剤を、ラベル化剤のリガンド近傍に導入した。ラベル化後は、消光剤とリガンドがタンパク質のリガンド結合部位に非共有結合的に残っているため、ラベル化された蛍光色素は消光される。これに、リガンド候補化合物を加えると残っていた消光剤がリガンドと共に追い出され、蛍光が回復する (Turn-On)。この Q-LDT 化学を用いて、リン酸化ペプチドを認識する SH2 ドメインが蛍光バイオセンサー化された。このような内在性のタンパク質をターゲットとしたラベル化およびセンサー化手法はこれまでに例がなく、LDT 化学により細胞本来の環境でのセンシングが可能となると期待できる。

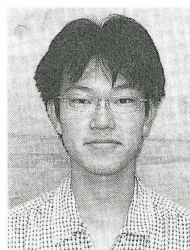
## 4 おわりに

生体内には、構造も機能も一様ではない多くのタンパク質が存在する。さらに、機能解析法自体も多様であり、目的・状況に応じて様々な解析が求められる。これらの要求を満たすため、本稿で紹介したように様々なタンパク質機能化法が必要であり、特色のあるバイオセンサーが開発されている。これらのバイオセンサーは、より詳細な生体機能の解析を可能とするだけでなく、生理活性物質の検出などを通じて創薬や医療などの分野でも応用されることが予想される。タンパク質の人工機能化とセンサーへの応用が、ケミカルバイオロジーの発展と幅広い分野に貢献することを期待する。

## 文 献

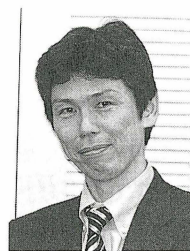
- 1) O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223 (1962).
- 2) D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier: *Gene*, **111**, 229 (1992).
- 3) R. Y. Tsien: *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 509 (1998).
- 4) R. Y. Tsien: *FEBS Letter*, **579**, 927 (2005).
- 5) A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien: *Nature*, **388**, 882 (1997).
- 6) H. Imamura, K. P. H. Nhat, H. Togawa, K. Saito, R. Iino, Y. K. Yamada, T. Nagai, H. Noji: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15651 (2009).
- 7) M. Zaccolo, F. D. Giorgi, C. Y. Cho, L. Feng, T. Knapp, P. A. Negulescu, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, T. Pozzan: *Nat. Cell Biol.*, **2**, 25 (2000).
- 8) S. Lukasiewicz, A. F. Gorecki, J. Dobrucki, A. Polit, M. D. Wasylewska: *FEBS. J.*, **276**, 760 (2009).
- 9) V. V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Tersikh, A. Lukyanov: *Nat. Methods*, **3**, 281 (2006).
- 10) J. Berg, Y. P. Hung, G. Yellen: *Nat. Methods*, **6**, 161

- (2009).
- 11) I. Ghosh, A. D. Hamilton, L. Regan : *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5658 (2000).
  - 12) C. I. Stains, J. R. Porter, A. T. Ooi, D. J. Segal, I. Ghosh : *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10782 (2005).
  - 13) T. Ozawa, S. Nogami, M. Sato, Y. Ohya, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **72**, 5151 (2000).
  - 14) T. Ozawa, Y. Sako, M. Sato, T. Katamura, Y. Umezawa : *Nat. Biotech.*, **21**, 287 (2003).
  - 15) T. Ozawa, Y. Natori, M. Sato, Y. Umezawa : *Nat. Methods*, **4**, 413 (2007).
  - 16) T. Morii, K. Sugimoto, K. Makino, M. Otsuka, K. Imoto, Y. Mori : *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1138 (2002).
  - 17) R. Sakaguchi, K. Tainaka, N. Shimada, S. Nakano, M. Inoue, S. Kiyonaka, Y. Mori, T. Morii : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 1 (2009).
  - 18) A. Saghatelian, K. M. Guckian, D. A. Thayer, M. R. Ghadiri : *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 344 (2003).
  - 19) S. Howarka, L. Movileanu, O. Braha, H. Bayley : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12996 (2001).
  - 20) L. Movileanu, S. Howarka, O. Braha, H. Bayley : *Nat. Biotech.*, **18**, 1091 (2000).
  - 21) T. Luchian, S. H. Shin, H. Bayley : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 3766 (2003).
  - 22) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz : *Science*, **292**, 498 (2001).
  - 23) L. Wang, Z. Zhang, A. Brock, P. G. Schultz : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 56 (2003).
  - 24) A. Deiter, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz : *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11782 (2003).
  - 25) H. S. Lee, J. Guo, E. A. Lemke, R. D. Dimla, P. G. Schultz : *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 12921 (2009).
  - 26) T. Hohsaka, D. Kajihara, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido : *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 34 (1999).
  - 27) D. Kajihara, R. Abe, I. Iijima, C. Komiyama, M. Sisido, T. Hohsaka : *Nat. Methods*, **3**, 923 (2006).
  - 28) I. Hamachi, T. Nagase, S. Shinkai : *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12065 (2000).
  - 29) E. Nakata, Y. Koshi, E. Koga, Y. Katayama, I. Hamachi : *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13253 (2005).
  - 30) Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi : *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3272 (2006).
  - 31) S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi : *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 341 (2009).
  - 32) S. Tsukiji, H. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi : *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9046 (2009).



内之宮祥平 (Shohei UCHINOMIYA)

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂)。京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 博士後期課程在学中。《現在の研究テーマ》生物有機化学。《趣味》天体観測・読書。  
E-mail : uchinomiya.shohei @ t04.mbox.media.kyoto-u.ac.jp



浜地 格 (Itaru HAMACHI)

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂)。京都大学大学院工学研究科博士課程修了。京都大学工学博士。《現在の研究テーマ》生命化学, 超分子バイオ材料。《主な著書》“分子認識と超分子”(共著)(三共出版)。《趣味》ホークスの応援。  
E-mail : ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp